

24. 5. 2004

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

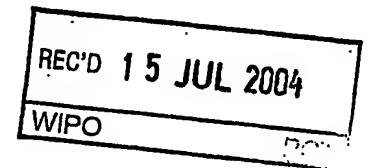
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 3 年 4 月 2 8 日

出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 1 2 4 3 4 0  
[ST. 10/C]: [ J P 2 0 0 3 - 1 2 4 3 4 0 ]

出 願 人  
Applicant(s): 積水化学工業株式会社

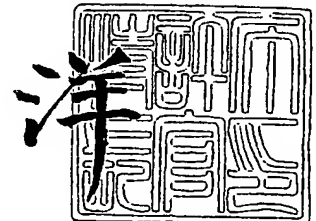


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 7 月 1 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 5 6 6 9 2

【書類名】 特許願

【整理番号】 03P00730

【提出日】 平成15年 4月28日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07G 17/00

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町百山 2 - 1 積水化学工業株式会社  
内

【氏名】 新村 和夫

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町百山 2 - 1 積水化学工業株式会社  
内

【氏名】 北原 慎一郎

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町百山 2 - 1 積水化学工業株式会社  
内

【氏名】 阿部 佳子

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町百山 2 - 1 積水化学工業株式会社  
内

【氏名】 栗山 澄

【特許出願人】

【識別番号】 000002174

【氏名又は名称】 積水化学工業株式会社

【代表者】 大久保 尚武

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005083

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 サイトカイン誘導材料及びサイトカイン誘導用具

【特許請求の範囲】

【請求項1】 サイトカイン誘導剤と、水に不溶性な多孔性の材料からなる担体とを含有することを特徴とするサイトカイン誘導材料。

【請求項2】 サイトカイン誘導剤は、担体に固定化されていることを特徴とする請求項1記載のサイトカイン誘導材料。

【請求項3】 サイトカイン誘導剤は、物理吸着で担体に固定化されていることを特徴とする請求項1又は2記載のサイトカイン誘導材料。

【請求項4】 担体は、巨大網目構造を有することを特徴とする請求項1、2又は3記載のサイトカイン誘導材料。

【請求項5】 担体は、細孔分布が2～2000Åであることを特徴とする請求項1、2、3又は4記載のサイトカイン誘導材料。

【請求項6】 担体は、高分子材料からなることを特徴とする請求項1、2、3、4又は5記載のサイトカイン誘導材料。

【請求項7】 担体は、ポリスチレン系、アクリルエステル系、ポリエステル系、ナイロン系、セルロース系、及び、ポリビニルアルコール系の各高分子材料からなる群から選択される少なくとも1種の高分子材料からなることを特徴とする請求項1、2、3、4、5又は6記載のサイトカイン誘導材料。

【請求項8】 担体は、ポリスチレン系、又は、アクリルエステル系の高分子材料からなることを特徴とする請求項1、2、3、4、5、6又は7記載のサイトカイン誘導材料。

【請求項9】 サイトカイン誘導剤は、菌体及び／又は菌体由来成分であることを特徴とする請求項1、2、3、4、5、6、7又は8記載のサイトカイン誘導材料。

【請求項10】 サイトカイン誘導剤は、抗酸菌及び／又は抗酸菌由来成分であることを特徴とする請求項9記載のサイトカイン誘導材料。

【請求項11】 サイトカイン誘導剤は、溶連菌及び／又は溶連菌由来成分であることを特徴とする請求項9記載のサイトカイン誘導材料。

【請求項 12】 サイトカイン誘導剤は、放線菌及び／又は放線菌由来成分であることを特徴とする請求項 9 記載のサイトカイン誘導材料。

【請求項 13】 誘導されるサイトカインが、インターフェロン $\gamma$ 、インターロイキン 2、インターロイキン 10、インターロイキン 12、腫瘍壊死因子 $\alpha$ 、及び、トランスフォーミング増殖因子 $\beta$ からなる群から選択される少なくとも 1 種のサイトカインであることを特徴とする請求項 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 又は 12 記載のサイトカイン誘導材料。

【請求項 14】 容器と、容器内に収納された請求項 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 又は 13 記載のサイトカイン誘導材料とを有することを特徴とするサイトカイン誘導用具。

【請求項 15】 容器内に収納されたサイトカイン誘導材料は、血液又は血液成分と接触することを特徴とする請求項 14 記載のサイトカイン誘導用具。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、サイトカイン誘導療法等に用いられ、効果的にサイトカインを誘導し得るサイトカイン誘導材料及びサイトカイン誘導用具に関する。

【0002】

【従来の技術】

サイトカインは、多種多様な細胞間情報伝達因子の総称である。サイトカインとしては、例えば、インターフェロン $\alpha$ 、インターフェロン $\beta$ 、インターフェロン $\gamma$ （IFN- $\gamma$ ）、インターロイキン 1～インターロイキン 27、腫瘍壊死因子 $\alpha$ （Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ ）、腫瘍壊死因子 $\beta$ （Tumor Necrosis Factor- $\beta$ ）、トランスフォーミング増殖因子 $\alpha$ （Transforming Growth Factor- $\alpha$ ）、トランスフォーミング増殖因子 $\beta$ （Transforming Growth Factor- $\beta$ 、TGF- $\beta$ ）、及び、各種細胞増殖因子等が挙げられる（非特許文献 1、非特許文献 2、非特許文献 3）。

【0003】

サイトカインは生体内で様々な活性を有し、様々な疾患に関与していることが知られている。このようなサイトカインの活性を生体内で惹起して疾患の治療を行う、サイトカイン誘導療法が従来より行われている。サイトカイン誘導療法では、患者に、サイトカイン誘導剤を投与し、生体内においてサイトカインの誘導を引き起こす。このようなサイトカイン誘導療法に用いられるサイトカイン誘導物質として、様々な物質が知られている。例えば、微生物由来のOK-432、BCG、ベスタチン、丸山ワクチン、又は、ロムリチド等が知られており、担子菌類由来のサイトカイン誘導物質として、クレスチン、レンチナン、又は、シゾフィラン等が知られている。

#### 【0004】

例えば、OK-432やBCG等は血液等からインターロイキン1やインターフェロン $\gamma$ 等のサイトカインを誘導することが知られている（非特許文献4、非特許文献5）。

#### 【0005】

上述したサイトカイン誘導療法では、生体内でサイトカインを誘導することはできるが、充分量のサイトカインを誘導することが困難であり、強い効力を発揮させ難いという問題があった。また、サイトカインを効果的に誘導するために、サイトカイン誘導剤の投与量が多くなり、副作用が大きくなり、治療を有効に行い得ないという問題もあった。

#### 【0006】

特許文献1には不溶性担体に刺激剤が共有結合されている悪性腫瘍治療用白血球刺激材が記載されている。また、特許文献2にはインターロイキン1、OK-432、遺伝子組み換えインターロイキン2、又は、 $\gamma$ -インターフェロンを不溶性担体に共有結合で結合してなる癌治療用白血球刺激材が記載されている。これらは腫瘍障害性細胞を誘導するものであり、これらの先行技術文献にはサイトカイン誘導については全く述べられていない。

#### 【0007】

#### 【非特許文献1】

臨床免疫第27巻特別増刊号1995年「サイトカインのすべて」科学評論社

## 【非特許文献2】

臨床免疫第36巻、39-44、2001年

## 【非特許文献3】

臨床免疫第39巻、189-200、2003年

## 【非特許文献4】

岐阜大医紀43:166-177、1995年

## 【非特許文献5】

Molecular medicine Vol. 36、臨時増刊号、220-229、1999年

## 【特許文献1】

特開昭60-120821号公報

## 【特許文献2】

特開昭61-277628号公報

## 【0008】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記現状に鑑み、従来のサイトカイン誘導療法に比べてより効果的にサイトカインを誘導し得る新規なサイトカイン誘導材料及びサイトカイン誘導用具を提供することを目的とする。

## 【0009】

## 【課題を解決するための手段】

本発明は、サイトカイン誘導剤と、水に不溶性な多孔性の材料からなる担体とを含有するサイトカイン誘導材料である。なお、上記担体としては、サイトカイン誘導剤のサイトカイン誘導作用を増強する誘導増強剤であることが好ましい。更に、サイトカイン誘導作用を増強する誘導増強剤はIFN- $\gamma$ の誘導を増強することが好ましい。

本願発明者らは、サイトカイン誘導剤とともに水に不溶性の多孔性材料からなる担体を含むサイトカイン誘導材料、又は、サイトカイン誘導剤が固定化された不溶性担体からなるサイトカイン誘導材料が、著しく高いサイトカイン誘導量を示すことを見だし、本発明を完成した。

以下に本発明を詳述する。

【0010】

本発明のサイトカイン誘導材料は、サイトカイン誘導剤と水に不溶性の多孔性材料からなる担体とを含有する。

上記担体としては、水に不溶性な多孔性の材料からなるものであれば特に限定されず、例えば、金属、有機物又は無機物等により構成され、好ましくは有機物材料、より好ましくは高分子材料からなる。

【0011】

上記金属としては、例えば、金若しくは金合金、銀若しくは銀合金、チタン若しくはチタン合金、又は、ステンレス等が挙げられる。

上記無機物としては、例えば、活性炭、ガラス又はガラスの誘導体、シリカ系組成物、アルミナ、ヒドロキシアパタイト等が挙げられる。

【0012】

上記有機物材料又は高分子材料としては、例えば、セルロース系、アガロース系、デキストラン系、ポリスチレン系、アクリルエステル系、ポリエチレンテレフタレート系、ナイロン系、ポリビニルアルコール系、ポリスルホン系、ポリアミド系、ポリアクリロニトリル系、ポリエチレン系、ポリウレタン系、ポリプロピレン系、ポリエステル系等の材料が挙げられる。

【0013】

上記ポリスチレン系の材料としては、例えば、ジビニルベンゼン-スチレン共重合体等が挙げられ、アクリルエステル系の材料としては、例えば、ポリメチルメタクリレート、ポリヒドロキシエチルメタクリレート等が挙げられる。

上記担体としては、なかでも、ポリスチレン系、アクリルエステル系、ナイロン系、ポリエステル系、セルロース系、ポリビニルアルコール系の高分子材料からなるものが好ましい。

【0014】

上記担体は無極性であり、疎水性であってもよく、この場合、担体としては、ポリスチレン系高分子材料等を用いることができる。また、これらの担体には表面修飾や表面コーティング等により、表面に親水性を付与することもできる。



上記サイトカイン誘導剤の上記担体への固定化を物理吸着法によって行う場合には、上記担体としては、イオン交換性官能基や親水性官能基を有しない、疎水性の強い表面を有する材料からなることが好ましく、イオン交換性官能基や親水性官能基を有しない、スチレンからなる高分子材料からなることがより好ましく、スチレンにジビニルベンゼン等の架橋剤を用いた高分子材料からなることが特に好ましい。

#### 【0015】

上記担体の形状としては特に限定されず、例えば、繊維状、不織布状、スポンジ状、粒子状、膜状、中空糸状等の公知の形状を用いることができる。

上記担体の大きさとしては、粒子状では好ましい下限は  $50\ \mu\text{m}$ 、好ましい上限は  $2\text{ mm}$  であり、繊維状では繊維径が  $10\ \mu\text{m}$  以下であることが好ましく、 $5\ \mu\text{m}$  以下であることがより好ましい。

上記担体が繊維状である場合は不織布からなることが好ましく、繊維径は  $3\ \mu\text{m}$  以下であることが好ましい。

#### 【0016】

上記担体は、白血球を吸着する材料からなることが好ましく、白血球を吸着する材料としては、例えば、ポリスチレン系、アクリルエステル系、ポリエステル系、ナイロン系、ポリビニルアルコール系、又は、酢酸セルロース等のセルロース系材料からなる高分子材料やガラス系の材料等が挙げられる。

#### 【0017】

上記担体としては、多孔性高分子材料からなるものが好ましい。

上記多孔性高分子材料の表面積としては、 $400\text{ m}^2/\text{g}$  以上であることが好ましく、細孔容積としては、 $0.5\text{ mL/g}$  であることが好ましく、平均細孔径としては、下限が  $20\ \text{\AA}$ 、上限が  $800\ \text{\AA}$  であることが好ましい。

#### 【0018】

上記多孔性高分子材料を大別すると標準的なゲル構造をもつゲル型と、巨大網目構造 (Macro reticular structure) をもつMR型とに分けられる。また、単にスチレンとジビニルベンゼンのような架橋剤を用いて重合して得られた多孔性樹脂等は透明に近く、ゲル構造を呈するのでゲル型多孔

性樹脂と呼ばれる。一方、特殊な重合法によると物理的に多孔性の樹脂等を製造することができ、このような樹脂はMR型又はポーラス型多孔性樹脂と呼ばれる。更に、懸濁重合の際において水に不溶でモノマーだけを溶かすことのできる特殊な有機溶剤を使用することにより、粒子の内部奥にまで大きな孔（マクロポア）をもったMR型又はポーラス型の粒子を作製することができる。

#### 【0019】

粒子状の多孔性高分子材料としては、例えば、強酸性陽イオン交換樹脂、弱酸性陽イオン交換樹脂、強塩基性陰イオン交換樹脂、弱塩基性陰イオン交換樹脂、合成吸着剤の他、キレート樹脂等からなるものが挙げられる。これらの多孔性粒子は公知の方法によって得ることができ、例えば、原料モノマーをゼラチン等の適当な懸濁安定剤を用いて水中で懸濁重合することにより球状の重合体として製造される。上記原料モノマーとしては、スチレン、ビニルトルエン、アクリル酸エチル、メタクリル酸メチル、アクリロニトリル等のエチレン性二重結合を有する化合物が用いられ、これにジビニルベンゼン、エチレンジメタクリレート等の多官能性モノマーである架橋剤を加え、多孔化剤の存在下過酸化ベンゾイル、アゾビスイソブチルニトリル等の重合開始剤を用いて架橋重合体を得る。上記多孔性粒子のうち市販されているものとしては、例えば、三菱化学社製ダイヤイオン（登録商標）、ロームアンドハース社製アンバーライト等、ダウケミカル製ダウエックス等が挙げられる。

#### 【0020】

上記担体としては、巨大網目構造を有する多孔性高分子材料がより好ましい。上記巨大網目構造の細孔分布としては、下限が2 Å、上限が2000 Åであることが好ましく、より好ましい上限は300 Åである。

#### 【0021】

上記サイトカイン誘導剤としては、例えば、BCG、BCG-CWS、PPD、Nocardia-CWS、OK-432、Muramyl dipeptide等の細菌類やその成分；PSK、レンチナン、シゾフィラン等の多糖類；ポリI：C、ポリA：U等のポリマー；Levamisole、DNCB、Azimexon、Tilorone、Bestatin等の化学物質が挙げられる。また

、上記のような生理活性物質に限らず、菌体、菌体成分、ペプチド類、核酸類、蛋白質、糖成分、脂質等の様々な物質もサイトカイン誘導剤として用いられ得る。

#### 【0022】

これらサイトカイン誘導剤の中でも、菌体及び／又はその菌体由来成分が好ましい。なかでも、抗酸菌と抗酸菌由来成分がより好ましく、結核菌や結核菌由来成分が特に好ましい。牛型結核菌弱毒株であるBCGとその由来成分も特に好ましい。

#### 【0023】

また、上記サイトカイン誘導剤としては、溶連菌及び／又は溶連菌由来成分や、放線菌及び／又は放線菌由来成分も好ましい。

また、上記サイトカイン誘導剤のみではサイトカイン誘導能を十分に発揮し得ないものであっても、上記担体と組み合わせて用いることにより、サイトカイン誘導活性を発揮させることもできる。従って、本発明におけるサイトカイン誘導剤としては、従来より用いられているサイトカイン誘導物質の他、様々な物質を用いることができる。

#### 【0024】

上記サイトカイン誘導剤を上記担体の表面に固定化するには、物理吸着、共有結合、イオン結合等の公知の方法を用いることができる。また、共有結合等による場合には、必要に応じて、上記サイトカイン誘導剤と上記担体との結合部に任意の長さをもつスペーサーを導入することが好ましい。

#### 【0025】

上記サイトカイン誘導剤が菌体等である場合は、必要に応じて、固定化する前に菌体の洗浄操作や破碎操作、成分分画操作等のさまざまな前処理を施してもよい。また、上記サイトカイン誘導剤が生菌等である場合は、より安全性を高めるために、必要に応じて、固定化する前、固定化と同時、固定化の後のいずれの時点でも、加熱処理・薬品処理・放射線処理・ガス滅菌処理等のさまざまな方法により死菌化してもよい。上記加熱処理としては、例えば、オートクレーブ処理が挙げられ、上記薬品処理としては、例えば、グルタルアルデヒド処理、ホルマリン

処理、又は、エタノール処理が挙げられ、上記放射線処理としては、例えば、 $\gamma$ 線処理が挙げられ、上記ガス滅菌処理としては、例えば、エチレンオキサイドガス処理等が挙げられる。

上記サイトカイン誘導剤としては、蛋白質変性剤で変性されているものが好適に用いられる。上記蛋白質変性剤としては、例えば、グルタルアルデヒド、ホルマリン、エタノール等の各種溶剤や界面活性剤等が挙げられる。また、加熱処理等も蛋白質変性作用を発揮するので、水溶液中での加熱処理等も上記蛋白質変性剤に含まれる。なかでも、ホルマリンにより変性されたサイトカイン誘導剤がより好ましい。

#### 【0026】

上記サイトカイン誘導剤がBCGのような微生物である場合は、菌体表面外壁成分のアミノ酸や糖成分等を介して、上記担体のカルボキシル基、アミノ基及び／又はエポキシ基等の官能基に結合させることができる。この際、必要に応じてさまざまな鎖長や構造のスペーサーを導入することもできる。

#### 【0027】

上記サイトカイン誘導剤がBCGのような菌体外層が脂質等により覆われている微生物である場合には、必要に応じて脂質を洗浄除去した後、上記担体の官能基に結合してもよい。

#### 【0028】

上記サイトカイン誘導剤を上記担体に固定化する方法としては、物理吸着法が好ましい。例えば、上記担体が疎水性表面を有し、上記サイトカイン誘導剤がBCGである場合、物理吸着作用によって固定化することができる。また、上記サイトカイン誘導剤が微生物やその成分であり、その表面が電荷を帯びている場合にも、その対極電荷を表面に有する担体に物理吸着作用によって固定化することができる。

#### 【0029】

上記担体の使用割合としては特に限定されないが、粒子状の担体として用いる場合には、血液容積に対する担体のかさ体積量として、下限は0.02%、上限は80%程度であり、好ましい下限は0.1%、好ましい上限は50%程度である。

。

#### 【0030】

上記サイトカイン誘導剤の使用割合としては特に限定されないが、例えば、BCGである場合は、血液に添加される濃度として、乾燥重量で下限は0.001mg/mL、上限は10mg/mLであることが好ましい。また、上記サイトカイン誘導剤がOK-432である場合は、血液に添加される濃度として、下限は0.0001KE/mL、上限は10KE/mLであることが好ましい。

#### 【0031】

本発明のサイトカイン誘導材料を容器内に収容することによりサイトカイン誘導用具を作成することができる。容器と、容器内に収納された本発明のサイトカイン誘導材料とを有するサイトカイン誘導用具もまた、本発明の1つである。

#### 【0032】

本発明のサイトカイン誘導用具では、上記担体とサイトカイン誘導剤とを含むサイトカイン誘導材料が、容器内にて血液又は血液成分等と接触し、それによって血液又は血液成分等の中でサイトカインが効果的に誘導される。この場合、接触温度を下限は15℃、上限は42℃の範囲とすることが好ましく、それによって、サイトカインの誘導をより効果的に引き起こすことができる。

#### 【0033】

なお、上記担体、及び、上記サイトカイン誘導剤は、予め混合されて血液と接触してもよく、又は、個別に血液若しくは血液成分等と接触してもよい。

また、本発明のサイトカイン誘導用具では、サイトカイン誘導材料を収納する容器の構造は特に限定されないが、図1に模式的に示すように、血液等の導入部1と、サイトカイン誘導材料と接触した血液4等を容器外に導く導出部2とが備えられている容器3が好ましい。

上記容器としては、カラム状の容器や血液バッグ状の容器等がより好ましい。

#### 【0034】

本発明のサイトカイン誘導用具には、サイトカイン誘導材料と接触させた血液等を容器外に導く場合に、サイトカイン誘導材料が血液に混入しないような、サイトカイン誘導材料流出防止機構が備えられていることが好ましい。

## 【0035】

図1に模式的に示すように、サイトカイン誘導材料流出防止機構5は、サイトカイン誘導材料があらかじめ脱離しないように、収納容器内部に固定化されていても良く、このような場合のサイトカイン誘導材料流出防止機構としては、例えば、流出防止用の分離膜や分離フィルター等が挙げられる。また、その他のサイトカイン誘導材料流出防止機構としては、例えば、遠心操作等によって血液と分離する機構等が挙げられる。

## 【0036】

必要によっては、サイトカイン誘導材料と接触させた血液等から血漿や血清成分等を分離して治療等に用いてもよい。

本発明のサイトカイン誘導用具の1実施態様としては、例えば、導入部と導出部を有する血液バッグに粒子状・繊維状・不織布状等の担体を含む本発明のサイトカイン誘導材料を充填し、ここに血液又は血液成分等を導入する。必要に応じて、サイトカインを誘導した血液又は血液成分等を導出部から取り出し利用することができる。これらの血液バッグの容量としては下限は50mL、上限は1000mLであることが好ましく、より好ましい下限は100mL、より好ましい上限は400mLである。これらの血液バッグは粒子状や繊維状、不織布状の本発明のサイトカイン誘導材料を収納することが好ましい。

## 【0037】

本発明のサイトカイン誘導材料又はサイトカイン誘導用具により誘導されるサイトカインとしては特に限定されないが、なかでも、インターフェロン $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、インターロイキン2 (IL-2)、インターロイキン10 (IL-10)、インターロイキン12 (IL-12)、腫瘍壊死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、トランスフォーミング増殖因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) が好適に挙げられる。例えば、IFN- $\gamma$  はリウマチ等の免疫疾患、炎症性疾患、アレルギー性疾患、癌等のさまざまな疾患において非常に重要な役割を担っているサイトカインであり、IFN- $\gamma$  を誘導することによりこれらの疾患に対する治療効果が期待できる。

## 【0038】

本発明のサイトカイン誘導材料及びサイトカイン誘導用具は、血液又は血液成分

等に限らず、骨髓系細胞、表皮細胞、繊維芽細胞、肝細胞、骨芽細胞、血液幹細胞、胚性幹細胞等の組織から採取した細胞や培養細胞、株化細胞等様々な細胞からもサイトカインを誘導することができる。

#### 【0039】

##### 【実施例】

以下に実施例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

#### 【0040】

なお、ヒト血漿中のIFN- $\gamma$ の測定は、R&D Systems社製ELISAキット又はENDOGEN社製ELISAキットにて行った。

#### 【0041】

##### (実施例1)

担体1 (オルガノ社製、商品名: アンバーライトXAD4、多孔性ポリスチレン粒子、MR型、細孔分布2~150 Å、表面積700 m<sup>2</sup>/g以上、細孔容積0.5 mL/g以上、平均細孔径約120 Å) を精製水 (大塚製薬社製) にてデカンテーションにより洗浄し、しかる後メタノール (和光純薬社製、HPLC用) にてデカンテーションすることにより洗浄した。次に、注射用生理食塩水 (大塚製薬社製) にて担体1をデカンテーションにより洗浄し、粒子かさ体積で50  $\mu$ Lの担体1を滅菌済みチューブ (ダイアヤトロン社製、エッペンドルフチューブ1.5 mL用) に充填した。

#### 【0042】

健常人から採血し、ヘパリン15 IU/mL含有静脈血を得た。血液に1 mg/mLの濃度となるように、BCG (日本BCG製造社製) を添加した。なお、BCGは生理食塩水で調製した。この際、生理食塩水の体積が血液に対して1.25%となるようにした。

#### 【0043】

上記BCGが添加された血液約1.45 mLを上記の担体1を充填したチューブに添加した。

次に、チューブを転倒混和して血液を攪拌し、ロータリーミキサー (TAITE

C社製)に取り付け、6rpmで転倒混和させつつ、37℃にて24時間恒温槽中でインキュベートした。インキュベート後の血液を4℃で3500rpm(トミー精工社製、微量高速遠心機MRX-150)で15分間遠心し、しかる後血漿を採取し、-70℃で該血漿を凍結保存した。次に、保存された血漿を、融解し、Human IFN- $\gamma$  ELISAキット(R&D System社製又はENDOGEN社製)にて血漿中のIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表1に示した。

また、用いた健常人の血液の採血直後及び上記と同様に血液のみを培養した後において、血漿中のIFN- $\gamma$ の値は全て10pg/mL以下であった。

#### 【0044】

##### (比較例1)

担体1を用いなかったことと、BCGを添加した血液1.5mLを用いたことを除いては、実施例1と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表1に示した。

#### 【0045】

##### (比較例2)

担体1を用いなかったことと、BCG無添加の血液を1.5mLを用いたことを除いては、実施例1と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表1に示した。

#### 【0046】

##### (比較例3)

BCGを血液に添加しなかったことを除いては、実施例1と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表1に示した。

#### 【0047】

##### (実施例2)

担体1を担体2(オルガノ社製、商品名:アンバーライトXAD16HP、ポリスチレン多孔性粒子、MR型、細孔分布2~300Å、表面積800m<sup>2</sup>/g以上、細孔容積0.58~0.65mL/g、平均細孔径約150Å)に変更したことを除いては実施例1と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表1



に示した。

【0048】

(比較例4)

BCGを血液に添加しなかったことを除いては、実施例2と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表1に示した。

【0049】

(実施例3)

担体1を担体3 (オルガノ社製、商品名: アンバーライトXAD2000、ポリスチレン多孔性粒子、MR型、細孔分布2~80 Å、表面積約620 m<sup>2</sup>/g、細孔容積約0.7 mL/g、平均細孔径約40~50 Å) に変更したことを除いては実施例1と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表1に示した。

【0050】

(比較例5)

BCGを血液に添加しなかったことを除いては、実施例3と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表1に示した。

【0051】

(実施例4)

担体1を担体4 (オルガノ社製、商品名: アンバーライトXAD7HP、アクリル酸系多孔性粒子、MR型、細孔分布2~2000 Å、表面積400 m<sup>2</sup>/g以上、細孔容積0.5 mL/g以上、平均細孔径約400~500 Å) に変更したことを除いては実施例1と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表1に示した。

【0052】

(比較例6)

BCGを血液に添加しなかったことを除いては、実施例4と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表1に示した。

【0053】

(比較例7)

担体としてPolysciences社製の商品名Polybeads Pol

ystyrene Microsphere (粒子径500-600 $\mu$ m、非多孔性)を用いたことを除いては、実施例1と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表1に示した。

【0054】

(比較例8)

担体としてモリテックス社製球状ポリスチレン粒子(スチレン-ジビニルベンゼン共重合体、粒子径250-750 $\mu$ m、非多孔性)を用いたことを除いては、実施例1と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表1に示した。

【0055】

(比較例9)

担体としてモリテックス社製球状ポリメチルメタクリレート粒子(粒子径750-1000 $\mu$ m、非多孔性)を用いたことを除いては、実施例1と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表1に示した。

【0056】

(比較例10)

担体としてPolysciences社製の商品名Polybeads Polystyrene Microsphere (粒子径500-600 $\mu$ m、非多孔性)を用いたことを除いては、比較例2と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表1に示した。

【0057】

(比較例11)

担体としてモリテックス社製球状ポリスチレン粒子(スチレン-ジビニルベンゼン共重合体、粒子径250-750 $\mu$ m、非多孔性)を用いたことを除いては、比較例2と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表1に示した。

【0058】

(比較例12)

担体としてモリテックス社製球状ポリメチルメタクリレート粒子(粒子径750-1000 $\mu$ m、非多孔性)を用いたことを除いては、比較例2と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表1に示した。

【0059】

【表1】

		IFN- $\gamma$ 濃度 (pg/mL)
実施例	1	231
	2	181
	3	186
	4	142
比較例	1	86
	2	<10
	3	<10
	4	<10
	5	<10
	6	<10
	7	78
	8	72
	9	77
	10	<10
	11	<10
	12	<10

【0060】

(実施例5)

BCGに替えて、ピシバニール（中外製薬社製、OK-432）を、0.1KE/mLの濃度となるように各血液に添加した。なお、OK-432は、注射用生理食塩水（大塚製薬社製）で調製されたものであり、生理食塩水が血液に対して1%となるように調製した。OK-432が添加された血液を、担体1がかさ体積で20 $\mu$ L充填された上記チューブに、チューブの目盛りが1.5mLとなるように添加した。すなわち、血液を約1.48mL添加した。

その他は、実施例 1 と同様にして、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 2 に示した。

また、用いた健常人の血液の採血直後及び上記と同様に血液のみを培養した後に、血漿中の IFN- $\gamma$  の値は全て 10 pg/mL 以下であった。

【0061】

(比較例 13)

担体 1 を用いなかったことと、及び、OK-432 添加血液を 1.5 mL 用いたことを除いては、実施例 5 と同様にして IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 2 に示した。

【0062】

(比較例 14)

担体 1 を用いなかったこと、及び、OK-432 無添加の血液を 1.5 mL 用いたことを除いては、実施例 5 と同様にして IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 2 に示した。

【0063】

(比較例 15)

OK-432 を血液に添加しなかったことを除いては、実施例 5 と同様にして IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 2 に示した。

【0064】

(実施例 6)

担体 1 を担体 2 (オルガノ社製、商品名: アンバーライト XAD16HP、ポリスチレン多孔性粒子、MR 型、細孔分布 2~300 Å、表面積 800 m<sup>2</sup>/g 以上、細孔容積 0.58~0.65 mL/g、平均細孔径約 150 Å) に変更したことを除いては実施例 5 と同様にして IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 2 に示した。

【0065】

(比較例 16)

OK-432 を血液に添加しなかったことを除いては、実施例 6 と同様にして IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 2 に示した。

## 【0066】

(実施例 7)

担体 1 を担体 3 (オルガノ社製、商品名: アンバーライト XAD2000、ポリスチレン多孔性粒子、MR 型、細孔分布  $2 \sim 80 \text{ \AA}$ 、表面積約  $620 \text{ m}^2/\text{g}$ 、細孔容積約  $0.7 \text{ mL/g}$ 、平均細孔径約  $40 \sim 50 \text{ \AA}$ ) に変更したことを除いては実施例 5 と同様にして IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 2 に示した。

## 【0067】

(比較例 17)

OK-432 を血液に添加しなかったことを除いては、実施例 7 と同様にして IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 2 に示した。

## 【0068】

(実施例 8)

担体 1 を担体 4 (オルガノ社製、商品名: アンバーライト XAD7HP、アクリル酸系多孔性粒子、MR 型、細孔分布  $2 \sim 2000 \text{ \AA}$ 、表面積  $400 \text{ m}^2/\text{g}$  以上、細孔容積  $0.5 \text{ mL/g}$  以上、平均細孔径約  $400 \sim 500 \text{ \AA}$ ) に変更したことを除いては実施例 5 と同様にして IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 2 に示した。

## 【0069】

(比較例 18)

OK-432 を血液に添加しなかったことを除いては、実施例 8 と同様にして IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 2 に示した。

## 【0070】

(比較例 19)

担体として Polysciences 社製の商品名 Polybeads Polystyrene Microsphere (粒子径  $500 \sim 600 \mu\text{m}$ 、非多孔性) を用いたことを除いては、実施例 5 と同様にして IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 2 に示した。

## 【0071】

(比較例 20)

担体としてモリテックス社製球状ポリスチレン粒子（スチレンージビニルベンゼン共重合体、粒子径 $250-750\mu\text{m}$ 、非多孔性）を用いたことを除いては、実施例5と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表2に示した。

**【0072】**

（比較例21）

担体としてモリテックス社製球状ポリメチルメタクリレート粒子（粒子径 $750-1000\mu\text{m}$ 、非多孔性）を用いたことを除いては、実施例5と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表2に示した。

**【0073】**

（比較例22）

担体としてPolysciences社製の商品名Polybeads Polystyrene Microsphere（粒子径 $500-600\mu\text{m}$ 、非多孔性）を用いたことを除いては、比較例15と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表2に示した。

**【0074】**

（比較例23）

担体としてモリテックス社製球状ポリスチレン粒子（スチレンージビニルベンゼン共重合体、粒子径 $250-750\mu\text{m}$ 、非多孔性）を用いたことを除いては、比較例15と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表2に示した。

**【0075】**

（比較例24）

担体としてモリテックス社製球状ポリメチルメタクリレート粒子（粒子径 $750-1000\mu\text{m}$ 、非多孔性）を用いたことを除いては、比較例15と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表2に示した。

**【0076】**

【表 2】

		IFN- $\gamma$ 濃度 (pg/mL)
実施例	5	255
	6	236
	7	211
	8	192
比較例	13	107
	14	<10
	15	<10
	16	<10
	17	<10
	18	<10
	19	89
	20	86
	21	84
	22	<10
	23	<10
	24	<10

## 【0077】

## (実施例 9)

担体 1 (オルガノ社製、アンバーライト XAD-4) かさ体積 1 mL と BCG (10 mg/mL) 1 mL とを生理食塩水中で 37℃ にて 20 時間混和し、BCG を担体 1 の粒子表面に物理吸着させた。混和後、担体 1 を生理食塩水にて充分洗浄し、再び生理食塩水に懸濁した。このようにして得られた、かさ体積 100  $\mu$ L 担体 1 を滅菌済みチューブに充填した。以下、このチューブに血液を 1.4 mL 添加したことを除いては実施例 1 と同様な操作を行い、健常人の血液により IFN- $\gamma$  の誘導量を測定した。結果を表 3 に示した。

また、用いた健常人の血液の採血直後及び上記と同様に血液のみを培養した後において、血漿中の IFN- $\gamma$  の値は全て 10 pg/mL 以下であった。

【0078】

(実施例 10)

担体 1 を担体 2 (オルガノ社製、アンバーライト XAD 16 HP) に替えた以外は実施例 9 と同様な操作を行い、健常人の血液により IFN- $\gamma$  の誘導量を測定した。結果を表 3 に示した。

【0079】

(実施例 11)

担体 1 を担体 3 (オルガノ社製、アンバーライト XAD 2000) に替えた以外は実施例 9 と同様な操作を行い、健常人の血液により IFN- $\gamma$  の誘導量を測定した。結果を表 3 に示した。

【0080】

(実施例 12)

担体 1 を担体 4 (オルガノ社製、アンバーライト XAD 7 HP) に替えた以外は実施例 9 と同様な操作を行い、健常人の血液により IFN- $\gamma$  の誘導量を測定した。結果を表 3 に示した。

【0081】

(比較例 25)

担体を用いなかったことと、BCG 添加血液を 1.5 mL を用いたことを除いては実施例 9 と同様に IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 3 に示した。

【0082】

(比較例 26)

BCG を物理吸着していない担体を用いたことを除いては、実施例 9 と同様に IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 3 に示した。

【0083】

(比較例 27)

BCG を物理吸着していない担体を用いたことを除いては、実施例 10 と同様に IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 3 に示した。



## 【0084】

(比較例 28)

BCGを物理吸着していない担体を用いたことを除いては、実施例11と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表3に示した。

## 【0085】

(比較例 29)

BCGを物理吸着していない担体を用いたことを除いては、実施例12と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表3に示した。

## 【0086】

(比較例 30)

担体としてPolysciences社製商品名: Polybeads Polystyrene Microsphere (粒子径500-600 $\mu$ m、非多孔性)を用いたことを除いては実施例9と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表3に示した。

## 【0087】

(比較例 31)

担体としてモリテックス社製球状ポリスチレン粒子(スチレン-ジビニルベンゼン共重合体、粒子径250-750 $\mu$ m、非多孔性)を用いたことを除いては実施例9と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表3に示した。

## 【0088】

(比較例 32)

担体としてモリテックス社製球状ポリメチルメタクリレート粒子(粒子径750-1000 $\mu$ m、非多孔性)を用いたことを除いては実施例9と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表3に示した。

## 【0089】

(比較例 33)

BCGを物理吸着していない担体を用いたことを除いては、比較例30と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表3に示した。

## 【0090】

(比較例 34)

BCGを物理吸着していない担体を用いたことを除いては、比較例 31と同様に  
してIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表3に示した。

【0091】

(比較例 35)

BCGを物理吸着していない担体を用いたことを除いては、比較例 32と同様に  
してIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表3に示した。

【0092】

【表3】

		IFN- $\gamma$ 濃度 (pg/mL)
実施例	9	321
	10	283
	11	262
	12	126
比較例	25	84
	26	<10
	27	<10
	28	<10
	29	<10
	30	26
	31	22
	32	19
	33	<10
	34	<10
	35	<10

【0093】

(実施例 13)

担体1かさ体積1 mLとBCG (10 mg/mL) とを1 mLの1容積%ホルマリン液 (中性緩衝ホルマリン液、和光純薬工業社製) 含有生理食塩中で4℃にて20時間混和し、BCGを粒子表面に物理吸着させた。混和後、この粒子を生理食塩水にて充分洗浄した後、かさ体積で100  $\mu$ Lを滅菌済みチューブ (ダイヤトロン社製、1.5 mL用) に充填した。

【0094】

BCGのみの添加がないこと、及び、血液を1.4 mL添加したことを除いては実施例1と同様な操作を行い、IFN- $\gamma$ の誘導量を測定した。結果を表11に示した。

また、用いた健常人の血液の採血直後及び上記と同様に血液のみを培養した後において、血漿中のIFN- $\gamma$ の値は全て10 pg/mL以下であった。

【0095】

(比較例36)

BCGを添加しなかったことを除いては、実施例13と同様にしてIFN- $\gamma$ の誘導量を測定した。結果を表4に示した。

【0096】

(比較例37)

担体1を用いなかったことと、BCG添加 (1 mg/mL) 血液を1.5 mL用いたことを除いては、実施例13と同様にしてIFN- $\gamma$ の誘導量を測定した。結果を表4に示した。

【0097】

(比較例38)

担体としてPolysciences社製商品名: Polybeads Polystyrene Microsphere (粒子径500-600  $\mu$ m、非多孔性) を用いたことを除いては実施例13と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表4に示した。

【0098】

(比較例39)

担体としてモリテックス社製球状ポリスチレン粒子 (スチレン-ジビニルベンゼ

ン共重合体、粒子径 250-750  $\mu\text{m}$ 、非多孔性) を用いたことを除いては実施例 13 と同様にして IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 4 に示した。

【0099】

(比較例 40)

担体としてモリテックス社製球状ポリメチルメタクリレート粒子 (粒子径 750-1000  $\mu\text{m}$ 、非多孔性) を用いたことを除いては実施例 13 と同様にして IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 4 に示した。

【0100】

【表 4】

		IFN- $\gamma$ 濃度 (pg/mL)
実施例 13		256
比較例	36	<10
	37	102
	38	16
	39	14
	40	13

【0101】

(実施例 14)

実施例 13 と同様に作製した BCG を粒子表面に物理吸着させた担体 1 をかさ体積で 4 mL 血液バッグ (テルモ社製、分離バッグ 200 mL 用) に充填した。健康人から採血して得たヘパリン 15 IU/mL 含有の静脈血 50 mL をこの血液バッグに導入した。この血液バッグを 37℃ で 24 時間、穏やかに攪拌しながらインキュベートした。この血液中の IFN- $\gamma$  誘導量を実施例 1 と同様に測定した。結果を表 5 に示した。

また、用いた健康人の血液の採血直後及び上記と同様に血液のみを培養した後において、血漿中の IFN- $\gamma$  の値は全て 10 pg/mL 以下であった。

【0102】

(比較例 41)

BCGを物理吸着処理をしていない担体1を使用したこと以外は実施例14と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表5に示した。

【0103】

(比較例42)

担体1を用いなかったこと、及び、BCGの1mg/mL添加血液50mLを用いたことを除いては、実施例14と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表5に示した。

【0104】

(比較例43)

担体としてPolysciences社製商品名: Polybeads Polystyrene Microsphere (粒子径500-600 $\mu$ m、非多孔性)を用いたことを除いては実施例14と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表5に示した。

【0105】

(比較例44)

担体としてモリテックス社製球状ポリスチレン粒子(スチレン-ジビニルベンゼン共重合体、粒子径250-750 $\mu$ m、非多孔性)を用いたことを除いては実施例14と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表5に示した。

【0106】

(比較例45)

担体としてモリテックス社製球状ポリメチルメタクリレート粒子(粒子径750-1000 $\mu$ m、非多孔性)を用いたことを除いては実施例14と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表5に示した。

【0107】

【表 5】

		IFN- $\gamma$ 濃度 (pg/mL)
実施例 14		276
比較例	41	<10
	42	81
	43	26
	44	25
	45	22

## 【0108】

(実施例 15)

BCGを生理食塩水に懸濁して、リン酸緩衝液にて希釈し、4000rpmにて15分間遠心操作を行った。上清を捨て、再びリン酸緩衝液にて懸濁し、4000rpmにて15分間遠心操作を行った。これを3回行い、次に50%エタノール含有リン酸緩衝液にて懸濁し、4000rpm（トミー精工社製、微量高速遠心機MRX-150）にて15分間遠心操作を行った。次にエタノールにて懸濁し、4000rpmにて15分間遠心操作を行った。これを2回行い、再びリン酸緩衝液での洗浄を3回行った。この処理済みBCG2mgをカルボキシル基を導入した担体1（かさ体積1mL）にカルボジイミド法にて共有結合を行った。残った反応基をエタノールアミンにて反応させ、リン酸緩衝液にて洗浄後、リン酸緩衝液に懸濁した。このようにして得られた担体100 $\mu$ Lを滅菌済みチューブに充填した。

BCGのみの添加がないこと、及び、血液添加量を1.4mLにしたことを除いては実施例1と同様な操作を行い、IFN- $\gamma$ の誘導量を測定した。結果を表6に示した。

また、用いた健常人の血液の採血直後及び上記と同様に血液のみを培養した後において、血漿中のIFN- $\gamma$ の値は全て10pg/mL以下であった。

## 【0109】

(比較例 46)

BCGを共有結合しなかったことを除いては、実施例15と同様な操作を行い、IFN- $\gamma$ の誘導量を測定した。結果を表6に示した。

【0110】

(比較例47)

担体1を用いなかったこと、及び、BCGの1mg/mL添加血液1.5mLを用いたことを除いては、実施例15と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表6に示した。

【0111】

(比較例48)

担体としてPolysciences社製商品名: Polybeads Polystyrene Microsphere (粒子径500-600 $\mu$ m、非多孔性)を用いたことを除いては実施例15と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表6に示した。

【0112】

【表6】

		IFN- $\gamma$ 濃度 (pg/mL)
実施例15		122
比較例	46	<10
	47	72
	48	11

【0113】

【発明の効果】

本発明は、上述の構成よりなるので、本発明のサイトカイン誘導材料を、例えば、血液又は血液成分と接触させることにより、従来のサイトカイン誘導剤に比べて、サイトカインを効果的に誘導することができるので、本発明のサイトカイン誘導材料及びサイトカイン誘導用具は、サイトカインの誘導が有効である様々な疾患の治療に好適に用いることができる。

【図面の簡単な説明】

**【図 1】**

本発明のサイトカイン誘導用具の一例を示す模式的断面図である。

**【符号の説明】**

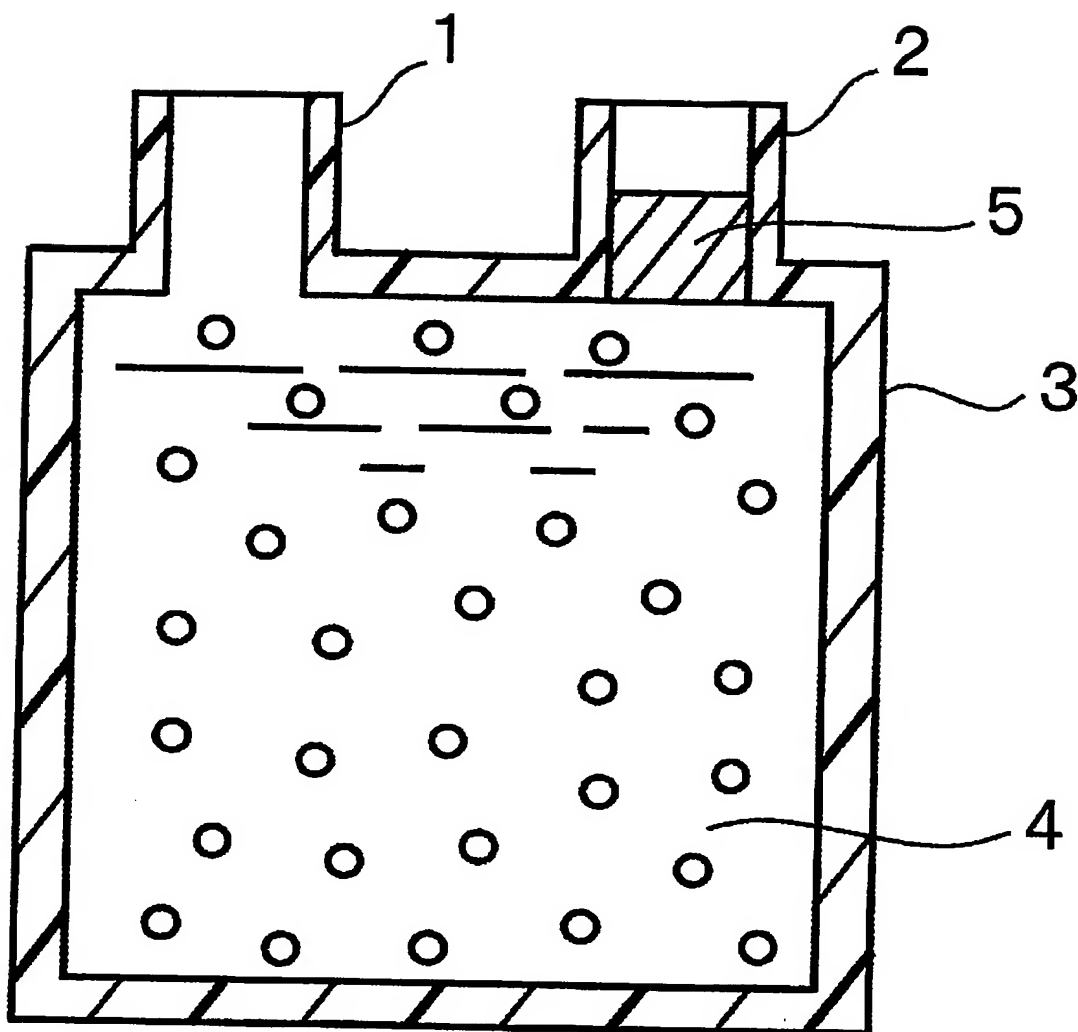
- 1 導入部
- 2 導出部
- 3 容器
- 4 サイトカイン誘導材料と接触した血液
- 5 サイトカイン誘導材料流出防止機構



【書類名】

図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 従来のサイトカイン誘導療法に比べてより効果的にサイトカインを誘導し得る新規なサイトカイン誘導材料及びサイトカイン誘導用具を提供する。

【解決手段】 サイトカイン誘導剤と、水に不溶性な多孔性の材料からなる担体とを含有するサイトカイン誘導材料及びサイトカイン誘導用具。

【選択図】 なし

特願 2003-124340

ページ: 1/E

出願人履歴情報

識別番号

[000002174]

1. 変更新月日  
[変更理由]

1990年 8月29日

新規登録

住所

大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号

氏名

積水化学工業株式会社